

氏名	岡 田 健 吾
学 位 の 種 類	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	甲 第 3248 号
学位授与年月日	平成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当者
学 位 論 文 名	X-Ray Crystallographic Study of Branched-Chain Amino Acid Aminotransferase from Escherichia coli : Structural Basis for Catalysis by Hexameric Aminotransferase (大腸菌由来分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素の結晶学的研究：六量体 アミノ基転移酵素による触媒反応の構造学的基礎)
論文審査委員	主 査 教 授 広 津 建 副主査 教 授 村 上 幸 夫 副主査 教 授 工 位 武 治

### 論 文 内 容 の 要 旨

大腸菌由来の分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素 (BCAT) はピリドキサル-5'-リン酸 (PLP) を補酵素に持つ、いわゆるビタミンB<sub>6</sub>酵素の1つでありilvE遺伝子上にコードされている。BCATはVal, Leu, Ileといった側鎖に枝別れのある疎水性アミノ酸およびグルタミン酸を基質とする分子量204,000 (サブユニット分子量34,000, 308残基) の6量体酵素である。BCATのように6量体で存在するアミノ基転移酵素は、これまでに立体構造が明らかになっているものと比較しても他に例を見ない。電子顕微鏡イメージから形態的な構造は捕らえられているが、原子レベルでその構造を明らかにし、酵素の基質認識や反応機構を解明するためにX線構造解析をおこなった。多重同型置換法およびそれを基にした分子置換法により2.1-2.4 Å分解能で、基質類似体との複合体2種類を含む合計4種類の立体構造の解析に成功した。本酵素のドメインやサブユニット間の相互作用を詳細に検討し、また、構造既知のアスパラギン酸アミノ酸基転移酵素やD-アミノ酸アミノ基転移酵素と全体構造や活性部位を比較することにより、他のアミノ基転移酵素とはまったく異なる基質認識の仕方や、その立体化学について考察した。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

大腸菌由来の分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素 (BCAT) は、六量体酵素で、分子量は204,000である。各サブユニットは一個の補酵素、ピリドキサル5'-リン酸 (PLP) を結合している。BCATはロイシン、イソロイシン、バリンなどの疎水性の側鎖を持つアミノ酸とグルタミン酸と基質とし、アミノ酸のアミノ基をケト酸へと転移する反応を触媒する。本論文は、BCATおよびその基質アナログとの複合体の高次構造を、単結晶X線構造解析法を用いて決定し、分子の全体構造、サブユニット間相互作用、活性部位の構造、および基質認識機構を明らかにしたものである。

大腸菌を用いて大量発現したBCATを試料として、結晶化を行い、高分解能X線解析が可能な結晶を得た。重原子誘導体の検索を幅広く行ったが、同型置換体として使えたのはHg誘導体一つだけであった。そこで、1サブユニットあたり7個あるメチオニンに着目し、これらのメチオニンをすべてセレノメチオニンで置換したBCATを発現させた。HgおよびSe誘導体を、同型置換体として用い、BCATの構造決定に成功した。さらに、基質認識機構を明らかにするために、BCATと4-methylvalerateおよび2-methylleucineとの複合体の構造を、分子置換法により決定した。

六量体アミノ酸転移酵素であるBCATは、基本的には、ダイマーが3個集合したものであり、その形状はD<sub>3</sub>の対称を持つ三角プリズム型であることを明らかにした。基質の $\alpha$ -カルボキシル基の認識機構は $\beta$ -ターン、チロシンの水酸基およびアルギニンのグアニジノ基の利用するユニークなものであった。疎水性の側鎖の認識部位を特定し、グルタミン酸の側鎖の認識部位も推定している。また活性部位に基質が結合すると、大きくゆらいでいた長いループ部分が活性部位を閉じ、基質を溶媒領域から隔離する事を示した。

以上のように、本論文は、BCATおよび基質アナログとの複合体の立体構造にもとづいて、酵素の機能を解明したものであり、構造化学の発展に寄与する多くの成果を得ており、博士（理学）の学位を授与するに値するものと審査した。